



TITLE:

マウス骨髄マクロファージにおけるLatex beadsのサイズに依存したIL-1 β 産生メカニズムの解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

足立, 匠

CITATION:

足立, 匠. マウス骨髄マクロファージにおけるLatex beadsのサイズに依存したIL-1 β 産生メカニズムの解析. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18425>

RIGHT:

マウス骨髄マクロファージにおける **Latex beads** の
サイズに依存した **IL-1 β** 産生メカニズムの解析

足立 匠

目次

要旨	・ ・ ・ ・ ・	2
序論	・ ・ ・ ・ ・	3
材料と方法	・ ・ ・ ・ ・	6
結果	・ ・ ・ ・ ・	10
考察	・ ・ ・ ・ ・	31
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	35
参考文献	・ ・ ・ ・ ・	36

要旨

石綿や空気中に含まれる粒子による健康被害が大きな問題として意識されつつある。これらの微細粒子は生体の免疫系細胞に認識され、時間が経過しても生体からの除去が難しいことから、様々な症状につながる継続的な炎症応答を生じる。本研究では、貪食性の高いマクロファージ (M ϕ) およびサイズの明確なポリスチレンラテックス粒子 (LxB) を用いて、微細粒子のサイズと細胞応答の相関を検討した。

骨髓細胞由来 M ϕ (BMDM) を、リポ多糖 (LPS) 存在下で 1,000, 100 および 20 nm 径の LxB で刺激したところ、20 nm LxB のみが細胞質内に大きな空砲を形成した。また、20 および 1,000 nm LxB は炎症性サイトカイン IL-1 β の産生に働いたが、100 nm LxB ではこの現象はみとめられなかった。上記の IL-1 β 産生は共に NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) 欠損の BMDM では消失した。20 nm LxB はライソソームからのカテプシン B の漏出を惹起し、これによる IL-1 β の産生は当該阻害剤および遺伝子の欠損にて抑制された。また、1,000 nm LxB は ROS (Reactive oxygen species) の産生を生じ、その産生源と思われる傷害を受けたミトコンドリアの蓄積が検出された。さらに 1,000 nm LxB による IL-1 β の産生は ROS 産生阻害剤およびスカベンジャーによって抑制された。

以上の結果から、BMDM は取り込む粒子のサイズによって異なる応答経路を用いて IL-1 β の産生をすることが明らかとなった。また、粒子のサイズによっては IL-1 β の産生が起こらない領域があることが示唆された。

序論

ナノ粒子は粒径が極めて小さい粒子状物質の総称で、既に医薬品、化粧品および塗装などに広く製品として用いられている。一方で、産業廃棄物等として環境中に排出されている物質でもあり、石綿禍等で知られる大きな社会問題にもなっている。これらの微細粒子は、生体の組織への透過性が高く、また排除が難しいことから、生体に長期に留まり毒性を発揮するものと思われる。これらの理由から、微細粒子の毒性の評価をふまえた新たな安全性基準が必要であるとされている[1-4]。

環境中の難分解性の微粒子を取り込んだ際に認められる病変としての生体の反応として、塵肺、肺線維症、アスベスト肺および中皮腫などが知られている。原因となる微粒子には環境中のシリカ、アスベスト、酸化チタン、針状カーボンナノチューブさらにディーゼル排気微粒子等様々である[4-10]。しかし、生体におけるこれらの粒子が原因とされる疾患の発症にいたるまでの詳細なプロセスについては、未だ明らかになってはいない。興味あることに、最近のこれらの異なる粒子が共通のメカニズムで炎症性サイトカインの一つである IL-1 β の産生に関与することが明らかとなった[11]。感染における IL-1 β は、炎症の初期において内因性の強力な発熱性物質としても作用する炎症性サイトカインであり、細菌感染に対する防御免疫において重要な働きをしている[12]。微細粒子による IL-1 β 産生機構については依然不明な点が多いが、その経路に細胞質内 PRRs (Pattern Recognition Receptors) の一つである NLRs (NOD-like-receptors) ファミリーが必要であることが、特にマクロファージ (M ϕ) や樹状細胞において明らかになってきた[13,14]。この NLRs のなかでも、NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) が、細菌由来の毒素[11]、細菌の菌体抗原 [15]、DAMPs (Damage-associated molecular pattern molecules) としての ATP [11]、尿酸結晶 [16] やミトコンドリアの DNA [17,18]、および内因性の難分解性のタンパク質であるアミロイドタンパク [19-21]、無機化合物や有機化合物のコレステロール結晶 [22,23]、アジュバントと用いられる水酸化アルミニウム[24]、そしてシリカやアスベスト [24-27]、カーボンナノチューブ [28]といった様々な難分解性微粒子に対する応答に必須であることが示されている。

この NLRP3 は活性化とともに、アダプタータンパク質である ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) を介して、プロカスペーゼ-1 を会合し、NLRP3 インフラマソーム複合体を形成する (図 1)。会合した

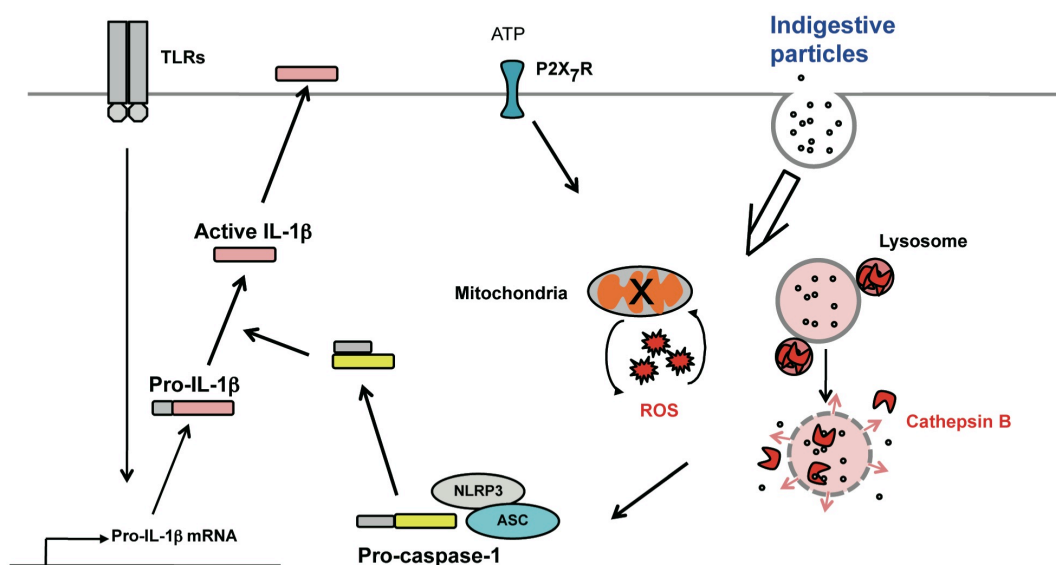


図 1. NLRP3 inflammasome の活性と IL-1β 産生の経路

プロカスパーゼ-1 は自己分解により、活性型となりプロテアーゼ活性を得る。一方で、別の PRRs、例えば TLR4 (Toll-like receptor 4) 等のシグナルによって産生される IL-1β前駆体 (pro-IL-1β) は不活性であるが、上記カスパーゼ-1 により活性型の IL-1βへと変換される [13]。最近、NLRP3 インフラマソーム活性化に関わる上流の現象として、

- ① ライソソームの崩壊によるタンパク分解酵素カテプシンの細胞質への漏出 [20,27]
- ② 傷害を受けた細胞が放出する ATP による当該レセプターP2X₇R 活性化または細菌由来のポアトキシンによる細胞内のK⁺イオンの流出 [11,29,30]
- ③ ファゴソーム依存的な ROS (reactive-oxygen-species) [15]、または傷害を受けたミトコンドリアによる ROS [31]の産生、

等が挙げられる。これらの現象を総括するような、かつ中心的にコントロールしている分子メカニズムの有無については定かでないが、これらが直接もしくは間接的に NLRP3 を活性化し、IL-1βの産生をもたらすと考えられている[17,32,33]。前述のような様々な微細粒子を用いた場合も例外ではなく、上記の現象のうちのどれか、もしくは同時にいくつかの現象が認められる。しかしながら、それら微細粒子を用

いた実験では、含まれる粒子の形状や径は多様であることから、上記の様な NLRP3 インフラマソーム複合体の誘導に関わる細胞内経路が同時に働いている可能性もある。また、これら ATP、ROS およびカテプシンを介したそれぞれの細胞内経路が独立して働き得るのかや、粒子のサイズに依存的な経路が存在するのかも明らかではない。そこで本研究では、材質・形状が同じで、サイズが明確な標準ポリスチレンラテックス粒子 (LxB) を用いて以上の点を明らかにすることを試みた。

本研究では、LPS 存在下でマウス骨髄より誘導した M ϕ (BMDM) を 1,000 nm、100 nm および 20 nm 径の LxB で刺激し、細胞の形態変化および IL-1 β の産生を検討すると共に、各種阻害剤および遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて IL-1 β 産生経路の同定を行った。その結果、1,000 と 20 nm LxB が IL-1 β 産生を誘導したが、20 nm 径の LxB のみが細胞内に大きな空胞 (vacuole) を形成することから、両者に細胞内経路の違いが示唆された。両 LxB は共に NLRP3 欠損 BMDM では IL-1 β 産生を誘導しなかったが、20 nm LxB のみがライソソームの崩壊を引き起こし、システインプロテアーゼであるカテプシン B の細胞質内漏出をもたらした。さらに 20 nm LxB による IL-1 β の産生はカテプシン B 依存的であることが阻害剤および KO マウスを用いて確認された。一方で、1,000 nm LxB の場合は、ROS の産生と ROS 産生源と思われる傷害を受けたミトコンドリアの蓄積を認めた。さらに、当該 IL-1 β の産生は ROS 産生阻害剤およびスカベンジャーにより阻害された。以上の結果より、NLRP3 を活性化する ROS 依存的な経路およびライソソームの崩壊・カテプシン B に依存的な経路が、それぞれ独立した経路として働き得ることが明らかになった。加えて、IL-1 β 産生を誘導しない LxB のサイズが存在する事も明らかになった。

材料と方法

マウス

BALB/c および C57BL/6 マウスは、日本 SLC (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) から購入した。LC3-GFP ノックインマウス [34]、パーキン KO [35]、TBP2 KO [36] および NLRP3 KO [11] マウスはそれぞれ東京医科歯科大学 (現東京大学) 医学研究科の水島昇先生、京都大学医学研究科の高橋良祐先生、同ウイルス研究所の淀井淳司先生および Genentech 社 Dixit V.M. 博士から供与を受けた。また、P2X₇KO ならびにカテプシン B KO [37] とカテプシン D KO [38] マウス骨髄細胞は九州大学医学研究科の石橋達郎先生および順天堂大学医学部の内山安男先生から提供されたものである。以上の遺伝子組み換えマウスは C57BL/6 バックグラウンドのものであるため、これらを用いる実験では対照として野生型 (WT) の C57BL/6 マウスを用いた。マウスは SPF 下で飼育し、生後 8 から 12 週齢にて実験に用いた。すべての動物実験は京都大学生命科学研究科のガイドラインに従って行った。

骨髄由来マクロファージ(BMDM)の調製

BMDM は溶血処理後の骨髄細胞 ($1.0 \times 10^5/\text{ml}$) を牛胎児血清 10%、L929 線維芽細胞培養上清 15%、2-メルカプトエタノール 50 μM 、ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ペニシリン 100 U/ml 含有の RPMI1640 培地にて径 10 cm のペトリディッシュで 5 - 6 日培養して誘導し、使用するまで -80°C で凍結保存した。使用に際しては、それを解凍し、上記培地で 2 日間培養し、5 mM エチレンジアミン 4 酢酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid)-リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) を用いて回収したものを以後の実験に用いた。

BMDM の刺激

一部のサイトカイン産生実験では、96 穴平底培養プレートに BMDM を 3×10^4 cells/100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 、もしくは 24 穴平底培養プレートでは 2.0×10^5 cells/1ml/well にして静置培養した。または、 3×10^4 cells/100 $\mu\text{l}/\text{tube}$ で 1.5 ml のマイクロチューブに分注し、RT-5 (TAITEC, Saitama, Japan) にて 1 rpm (ローター半径 9.5 cm) となるように設定し、回転攪拌状態で培養した。通常は、静置培養においては蛍光あるいは非蛍光の carboxyl-LxB (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 0.02% (v/v) の濃度で、攪拌培養では 1,000 nm の LxB は 0.06%、100 nm と 20 nm LxB は 0.02% の濃度で加え、さらに 10 ng/ml の ultra pure LPS (Invivogen, San Diego, CA) を加えて、それぞれ 24 時

間と 9 時間刺激した。KCl (75 mM) または NaCl (75 mM) を用いた実験では、それぞれを加えた培養液にて 3 時間前処理した後、LPS および LxB で 9 時間刺激した。その後、培養上清中の IL-1 β を測定した。阻害剤を用いた実験では、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D (Sigma-Aldrich, Irvine, CA)、ATPase であるアピラーゼ (Sigma-Aldrich Irvine, CA)、ROS-scavenger である N-アセチル-L-システイン (NAC) そしてカテプシン B の阻害剤である CA-074-Me (Calbiochem, Darmstadt, Germany) を細胞に LxB と LPS 刺激を加える 1 時間前に添加した。ATP で刺激する場合は、あらかじめ BMDM を 6 時間 LPS で刺激し、1 mM の ATP (Sigma-Aldrich) を加えた後、さらに 3 時間培養した。

BMDM に接着もしくは取り込まれた LxB の個数、表面積および体積の測定

BMDM を 0.02% の蛍光 LxB および LPS 10 ng/ml とともに 24 穴平底培養プレートにて培養し、24 時間後、氷上にて PBS で洗浄し、SDS 1% 含有 PBS を用いて細胞を溶解した。細胞溶解液の蛍光強度を Spectra Max Gemini プレートリーダー (Molecular Device, Downingtown, PA) を用いて計測した。LxB の数は蛍光 LxB の希釈列によって得た標準曲線から算出した。表面積および体積は LxB の直径から計算にて求めた。

サイトカインの定量およびウェスタンブロットによる IL-1 β プロセッシングの検討

IL-1 β はアルメニアンハムスター抗マウス IL-1 β モノクローナル抗体 (クローン B122; BD Biosciences, San Diego, CA) およびウサギのビオチン結合抗マウス IL-1 β 抗体 (e-Bioscience, San Diego, CA) 抗体を用いた ELISA により測定した。発色にはstreptavidin結合アルカリフォスファターゼ (Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA) および基質パラニトロフェニルリン酸塩 (Sigma-Aldrich) を使い、プレートリーダーにて 405 nm の波長を測定し、Recombinant mouse IL-1 β (BD Biosciences) を対照として定量を行った。TNF- α は Cytometric Bead Array (CBA) mouse inflammation kit (BD Biosciences) を用いて測定した。

Western blot による IL-1 β プロセッシングは以下のように行った。BMDM を 9 時間 LxB と LPS 存在下で攪拌培養した後、培養上清および細胞をそれぞれ回収した。細胞は Tris-HCl 緩衝液 pH7.2 に懸濁し、SDS サンプルバッファーを用いて溶解液を調製した。上清には等量の 2 倍濃度のサンプルバッファーを加えた。これらを、12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて 200 V 定電圧の条件で電気泳動し、続いてタンパク質をポリフッ化ビニリデン膜に転写した。次に、ヤギの抗マウス IL-1 β

ポリクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 、ウサギの抗マウスカスパーゼ-1 p10 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 、HRP 結合抗ヤギおよび HRP 抗ウサギ抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

顕微鏡観察

ポリ-L-リジンコートしたカバースリップ上で BMDM を 12 時間培養して接着させた後、細胞を 10 ng/ml の LPS と 0.02% の蛍光 LxB で刺激した。24 時間後、BMDM を 1%ホルマリンで固定し、位相差顕微鏡で観察した。核を染色する場合は、0.01%サポニンで透過処理を行った後、1 μ M の DAPI (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)で処理した。

Lamp-1 と LC3 の局在を検討する場合には、LC3-GFP ノックインマウスより調製した BMDM を LPS 存在下で LxB にて 15~18 時間刺激し、1%ホルマリンで細胞を固定した後に 0.01%サポニンで透過処理を行った。細胞をラット抗マウス CD107a/Lamp-1 (1D4B) モノクローナル抗体とラットのビオチン結合抗ラット IgG とアビジン-Cy3 を用いて、GFP をウサギ抗 GFP モノクローナル抗体 (Life Technology, Grand Island, NY)とヤギ FITC 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて免疫染色し、1% プロピルガレート (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) を含むグリセリン-PBS (1:1)で封入した後に、蛍光顕微鏡 BX51-FL (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察する場合は、細胞を 2.5%グルタルアルデヒドで 30 分固定した後、さらに 2%酸化オスミウム (VIII)で固定した。京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センターにて超薄切片を作成し、Hitachi H-7000 電子顕微鏡を用いて観察した。

死細胞の検出

攪拌培養で LxB および LPS 刺激した BMDM を、氷上でハックス緩衝液 (Hanks' Balanced Salt Solutions, HBSS)中で FITC 標識アネキシン V とヨウ化プロピオン酸 (PI) で染色した。20 分後遠心して、HBSS で一回洗浄、HBSS に懸濁した後、フローサイトメーター (BD FACSCalibur) および FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR) を用いて解析した。死細胞はアネキシン V⁺PI⁺として同定した。細胞死のポジティブコントロールとして、スタウロsporinで処理した細胞を用いた。

ライソソーム破裂の検出

ライソソームの破裂(破壊)とそれに伴うカテプシン B の細胞質内への漏出は、それぞれアクリジンオレンジ (Acridine orange: AO) およびカテプシン B に対する蛍光基質であるマジックレッド (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN) を用いて検出した。ガラス底培養器上で BMDM を予め 12 時間培養した後、LPS および LxB で 18 時間刺激した。最後の 20 分間に AO およびマジックレッド溶液を加え、直ちに BZ-8000 Biozero imaging device (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

有意差検定

有意差検定は two-tailed unpaired Student *t*-test または Tukey の多重比較検定を用いて行い、 $P < 0.05$ の場合に有意に差があるとした。

結果

LxB 刺激による BMDM の細胞内構造の変化

BMDM を LPS 10 ng/ml 存在下において 1,000、100 および 20 nm の LxB で 24 時間刺激し、蛍光顕微鏡（図 2A）および透過型電子顕微鏡（図 2B）で観察したところ、どのサイズの LxB も効果的に細胞内に取り込まれていることが確認された。また、20 nm LxB で刺激した BMDM には、細胞内に大きな空胞の形成が認められた（図 2、右端）。しかしながら 20 nm LxB はそれら空胞内には認められず、主に細胞質に存在していた。

次に、1,000 および 20 nm LxB を加えた BMDM をライソソームマーカーである Lamp-1 で、オートファゴソームマーカーの LC3 を融合タンパク質である GFP に対する抗体で免疫染色した結果、20 nm LxB の場合に Lamp-1 および LC3 が大きな空胞周囲に共局在していた（図 3）。したがって、20 nm LxB の場合は細胞内で大規模なオートファジーが起こり、リソソームと融合することで大きな空胞が形成されたものと予想される。

一方、1,000 nm LxB の場合には、若干の LC3-GFP⁺のシグナル検出するにとどまった。さらに、100 個の細胞につき細胞あたりの LC3-GFP⁺シグナルの個数を測定したところ、20 nm および 1,000 nm LxB 間で有意な差を認めた（図 4）。

サイズの異なる LxB による IL-1 β 産生誘導

次に、LPS および LxB で刺激した BMDM の IL-1 β 産生能について調べた。1,000、100 および 20 nm の LxB で刺激したところ、1,000 ならびに 20 nm LxB で刺激した BMDM は顕著な IL-1 β 産生を認めたが、100 nm LxB は用いたどの濃度でも IL-1 β の産生を誘導しなかった（図 5A）。

活性型 IL-1 β が産生・放出されるためには、pro-IL-1 β が活性型カスパーゼ-1によってプロセッシングされなければならないことから、pro-IL-1 β 、活性型 IL-1 β 、プロカスパーゼ（pro-caspase-1）および活性型カスパーゼ-1（caspase-1）をウェスタンブロット解析により検討した。その結果、1,000 および 20 nm LxB で刺激した BMDM では、カスパーゼ-1 前駆体（pro-caspase-1）の活性型カスパーゼ-1（caspase-1）へのプロセッシングが確認された（図 5B）。これに一致して、1,000 および 20 nm LxB では同時に IL-1 β 前駆体（pro-IL-1 β ）の活性型IL-1 β へのプロセッシングと細胞外への分泌が確認された。LPS による IL-1 β 前駆体の発現は LxB によって影響を受けなかった。さらに、LPS 存在下にて LxB で刺激した BMDM の培養上清中の TNF- α

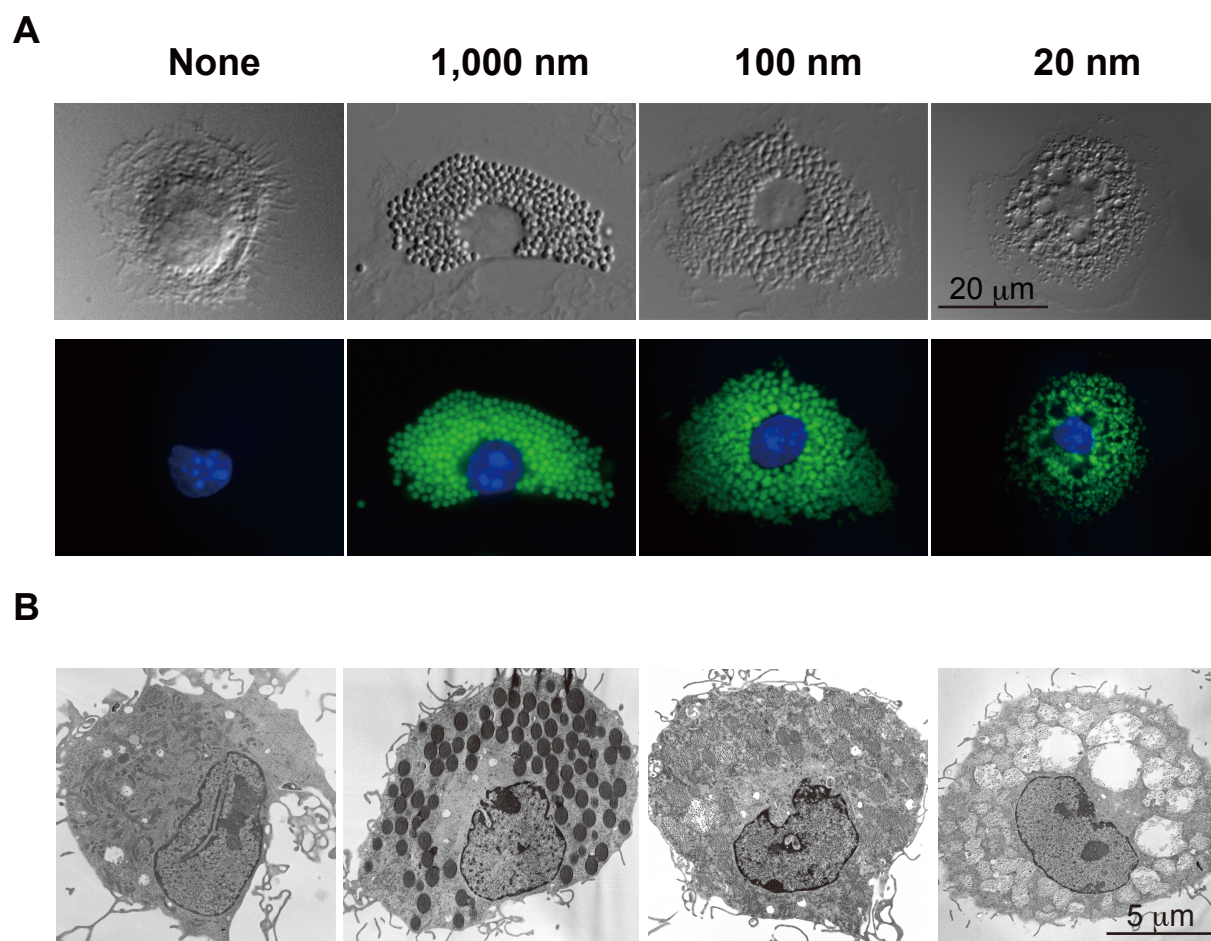


図 2. BMDM による LxB の取り込みと形態変化

A. カバースリップ上で培養した BMDM (BALB/c) に 1,000、100 および 20 nm の蛍光 LxB (0.02%) と LPS を加え、24 時間培養後に観察した。上段は位相差、下段は蛍光観察下を示す。

B. A と同様に、電子顕微鏡 (TEM) にて観察した。

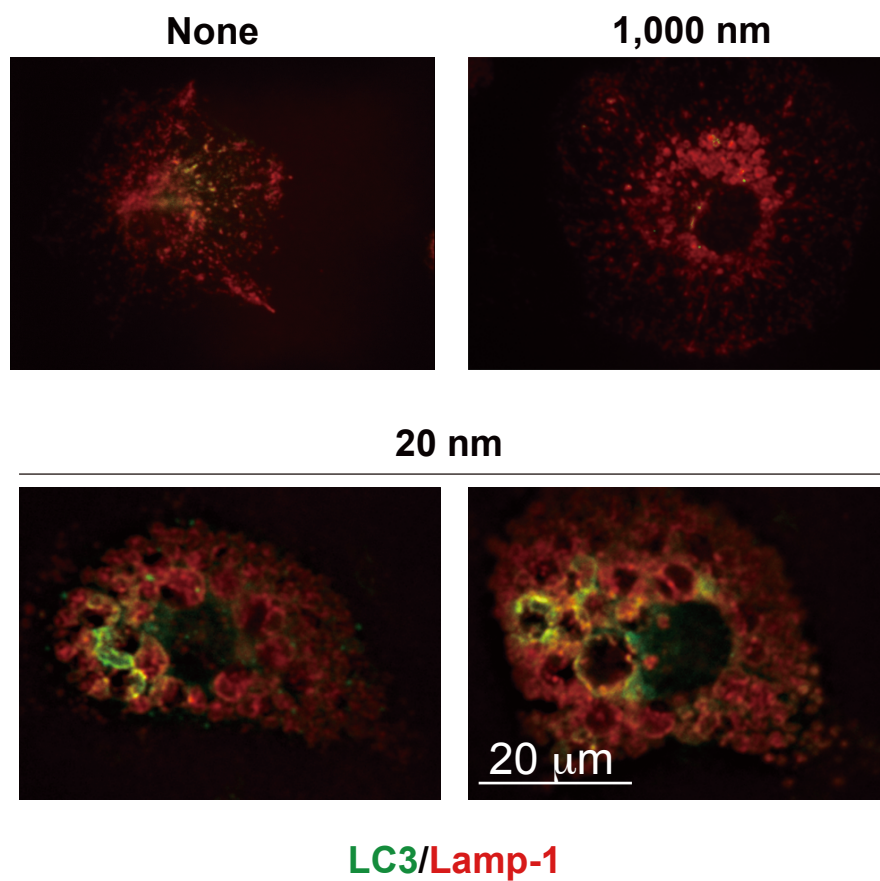


図 3. LxB で刺激した BMDM の LC3 および Lamp-1 の局在

LC3-GFP トランスジェニック BMDM をカバースリップ上で 12 時間前培養し、LPS および LxB で刺激した。18 時間後、1%ホルマリンで固定し、0.01%サポニンで透過処理を行った。anti-CD107a/Lamp-1 + ビオチン結合 anti-rat IgG + アビジン -Cy3、続いて anti-GFP + FITC 標識の anti-rabbit IgG を用いて染色した後、1% プロピルガレートを含むグリセリン-PBS (1:1) で封入し、蛍光顕微鏡観察した。

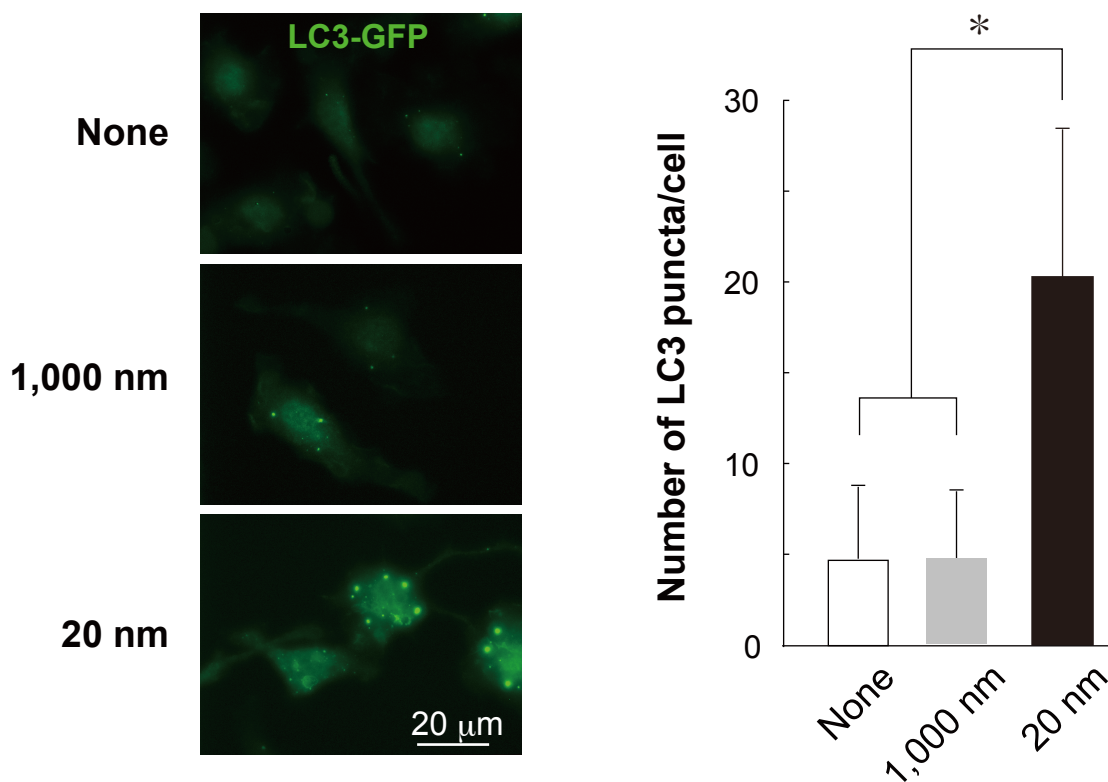


図 4. LxB で刺激した BMDM における LC3-GFP⁺ シグナルの形成

LC3-GFP トランスジェニック BMDM をカバースリップ上で 12 時間前培養し、LPS および LxB で刺激した。18 時間後、1% グルタルアルデヒドで固定し、1% プロピルガレートを含むグリセリン-PBS (1:1) で封入して、蛍光顕微鏡観察した。(左図) LC3-GFP のドットを計測した。(右図) *は $P < 0.01$ (Tukey 法による多重比較検定)

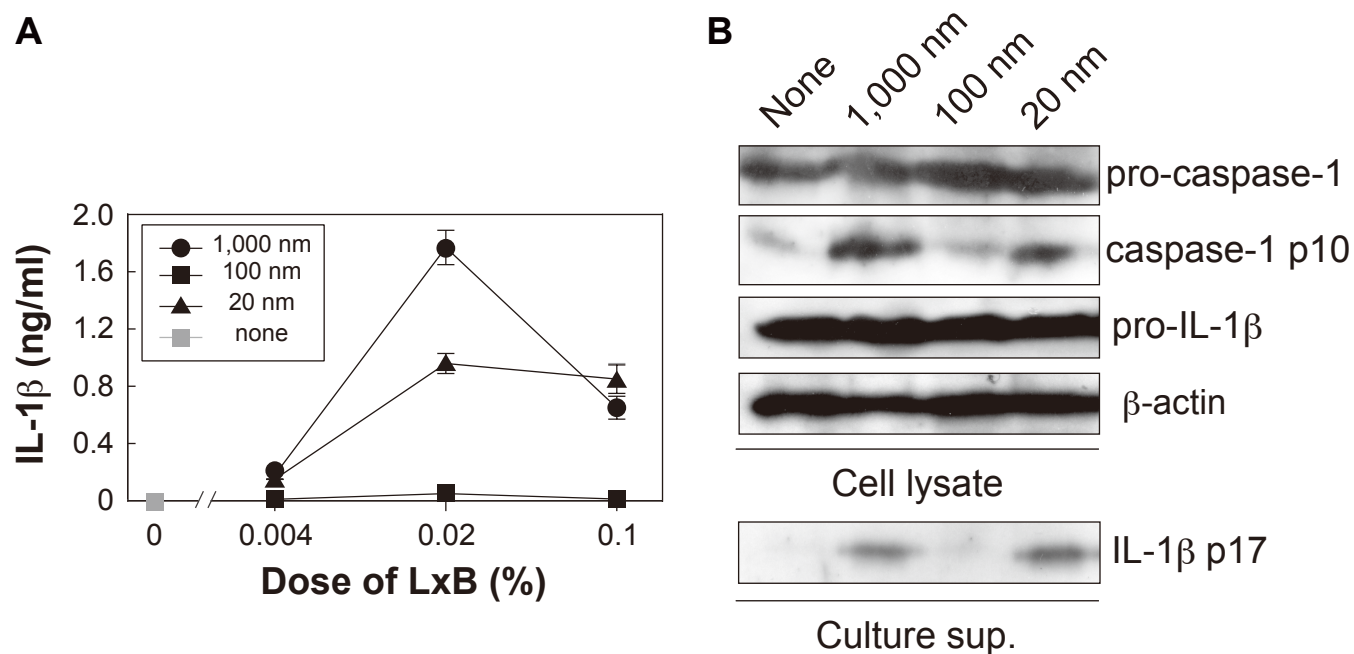


図 5. LxB 刺激した BMDM の IL-1 β 産生とカスパーゼ -1 のプロセッシング

A. BMDM (BALB/c) を LPS 存在下で様々な濃度の LxB とともに 24 時間培養し、培養上清中の IL-1 β を測定した。

B. BMDM を LPS および LxB で 9 時間刺激した後、細胞内の pro-caspase-1、caspase-1 p10、pro-IL-1 β および培地に分泌された IL-1 β (IL-1 β p17) の量を Western blot にて解析した。

を測定したところ、LxB のサイズの違いでその産生量が大きく異なることはなかった（図 6）。一方で 100 nm LxB はカスパーゼ-1 前駆体および IL-1 β 前駆体のプロセッシングを誘導しなかった。

このような 100 nm LxB の細胞に対する影響が、取り込まれる LxB の数や表面積、体積などに依存している可能性を検討するために、BMDM へ取り込まれた三種の蛍光 LxB の数、表面積および体積の総和を比較した。しかし、IL-1 β 産生誘導との明確な相関は得られなかった（図 7A）。

LxB による IL-1 β 産生には、LxB の細胞内への取り込みが必要であることを確認するため、エンドサイトーシス/ファゴサイトーシス阻害剤のサイトカラシン D の作用を調べたところ、1,000 および 20 nm LxB による IL-1 β 産生が殆ど認められなくなった（図 7B）。したがって、100 nm LxB は細胞内に細胞内に取り込まれるにもかかわらず、活性型カスパーゼ-1 を誘導できないと考えられる。

LxB の NLRP3 インフラマソーム依存的な BMDM の IL-1 β 産生誘導

上記の 20 nm と 1,000 nm LxB による IL-1 β 産生誘導の経路に違いがあるかを検討する為に、先ず NLRP3 インフラマソームの関与を検討した。NLRP3 KO マウスから作成した BMDM を LPS および LxB で刺激したところ、1,000 および 20 nm LxB は共に IL-1 β の産生を誘導できなかった（図 8A）。ところが LPS によって誘導される TNF- α の産生に対しては影響を及ぼさなかった。したがって、TLR4 を介する LPS からの NF- κ B の活性化は LxB 刺激の影響を受けていないと考えられた。よって、LxB による IL-1 β 産生は NLRP3 に依存することが明らかである。また、多くの NLRP3 インフラマソームの刺激因子による IL-1 β の産生は、細胞外への K⁺流出阻害の影響をうけることが知られている。そこで細胞外の K⁺濃度を高くしたところ、20 nm と 1,000 nm LxB による IL-1 β 産生が著しく減少した（図 8B）。従って、20 nm と 1,000 nm LxB による IL-1 β 産生は、細胞外への K⁺流出が関わる NLRP3 インフラマソームの活性に依存的である事が示唆された。

攪拌培養における BMDM からの LPS と LxB 刺激による IL-1 β 産生

上記に述べてきた静置培養下では、LxB 粒子径の大きい方が速く沈降する。その為、細胞と接する LxB の数が、そのサイズにより大きく異なる可能性がある。そこで、細胞を LxB と共にチューブ内で常時混和しつつ刺激する攪拌培養を行ってみた。始めに、BMDM (3.0x10⁴/チューブ) を LPS 10 ng/ml および様々な濃度の LxB と共に 9 時間培養し IL-1 β を測定した。その結果、20 nm LxB は 0.02%付近で高い IL-1 β 産生能を示したが、高濃度領域ではその産生能は低下した（図 9A）。一

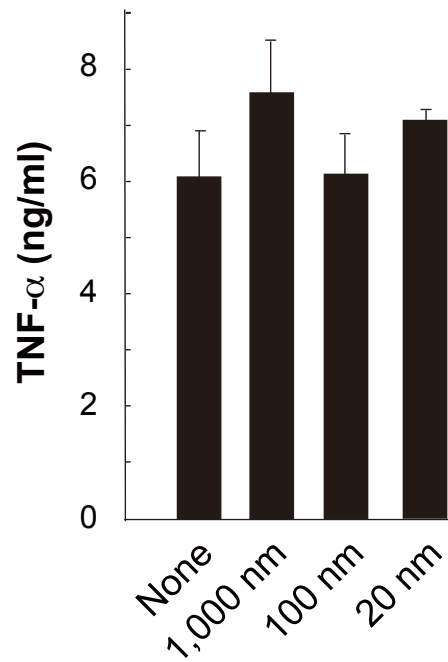


図 6. LxB,LPS で刺激した BMDM の TNF- α 産生

BMDM (BALB/c) を LPS 存在下で 1000、100、20 nm の LxB 0.02% とともに 24 時間培養し、培養上清中の TNF- α を測定した。

A

LxB	number (/cell)	surface area (μm^2 /cell)	volume (μm^3 /cell)
1,000 nm	46 \pm 6.58	146.87 \pm 20.65	24.48 \pm 3.44
100 nm	27490 \pm 1731	863.19 \pm 54.36	14.39 \pm 0.91
20 nm	1256193 \pm 74994	1577.78 \pm 94.13	5.26 \pm 0.31

Values are shown with the mean \pm S.D.

B

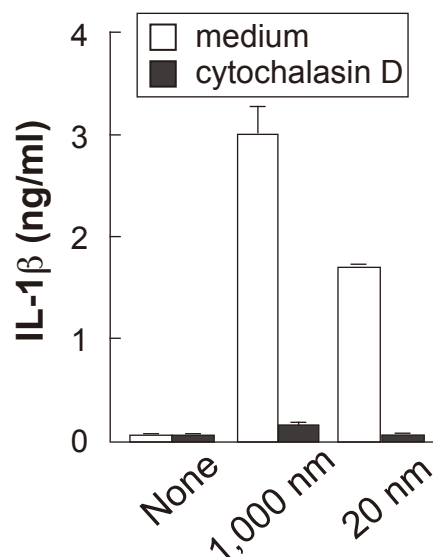


図7. BMDMによるLxBの取り込みとIL-1 β 産生への関与

A. BMDM (2.0×10^5 /well) をLPS (10 ng/ml) 存在下で蛍光LxBとともに24時間培養した。細胞を溶解後、蛍光強度をプレートリーダーにて測定し、接着もしくは取り込まれたLxBの数、表面積、体積を算出した。

B. BMDM (3.0×10^4 /well) に1 μM のサイトカラシンDを加え、1時間培養した後、LPS 10 ng/mlとLxB 0.02%を加え、24時間培養した。

B. 上清中のIL-1 β をELISAにて測定した。

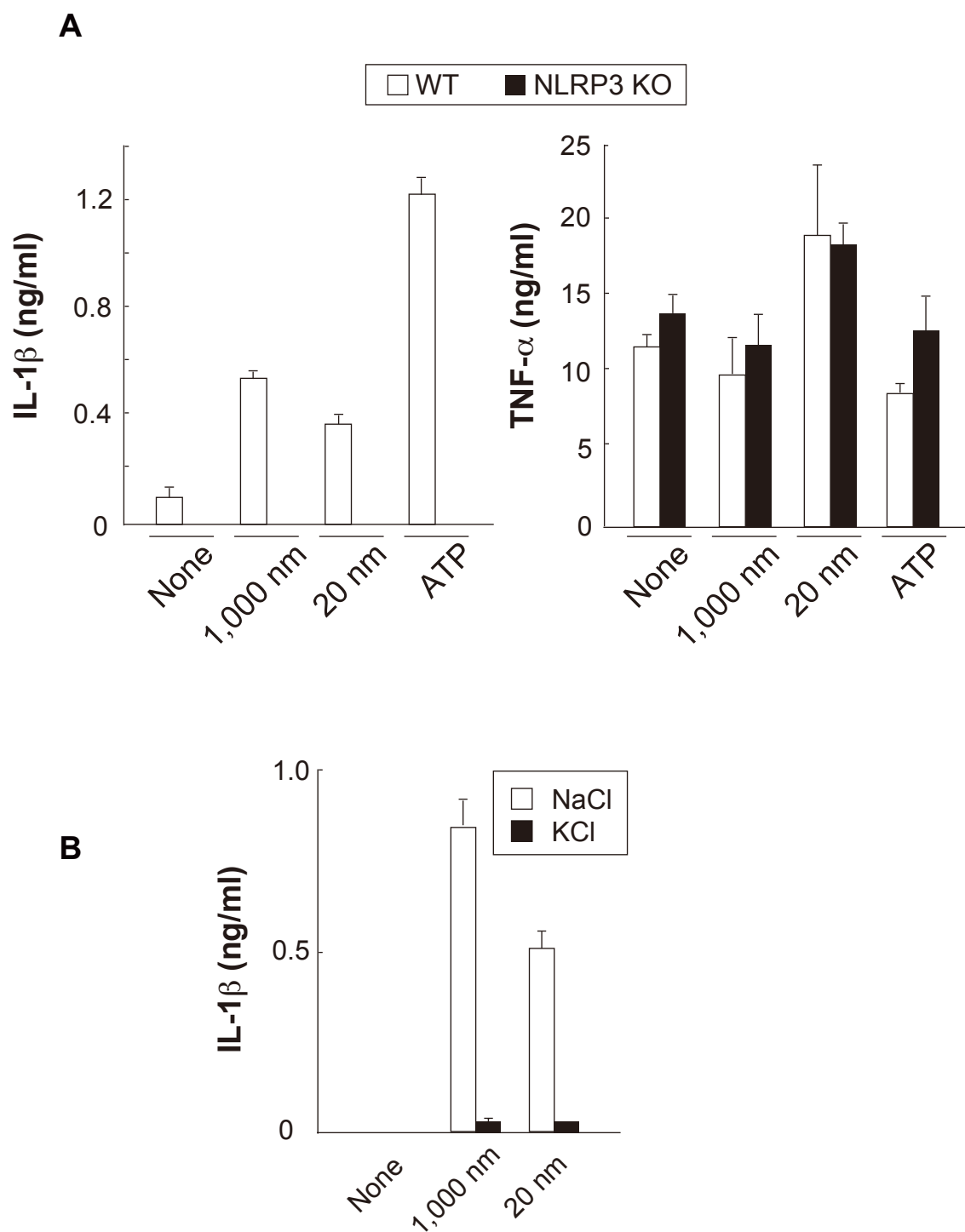


図 8. NLRP3-inflammasome 依存的な LxB による IL-1 β 産生誘導

A. NLRP3 KO および WT の BMDM (C57BL/6) を LPS (10 ng/ml)、LxB (0.02%) で 24 時間刺激し、培養上清中の IL-1 β および TNF- α を測定した。B. BMDM を KCl (75 mM) または NaCl (75 mM) を加えた培養液中にて 3 時間前処理した後、LPS および LxB で 9 時間刺激した。その後、培養上清中の IL-1 β を測定した。

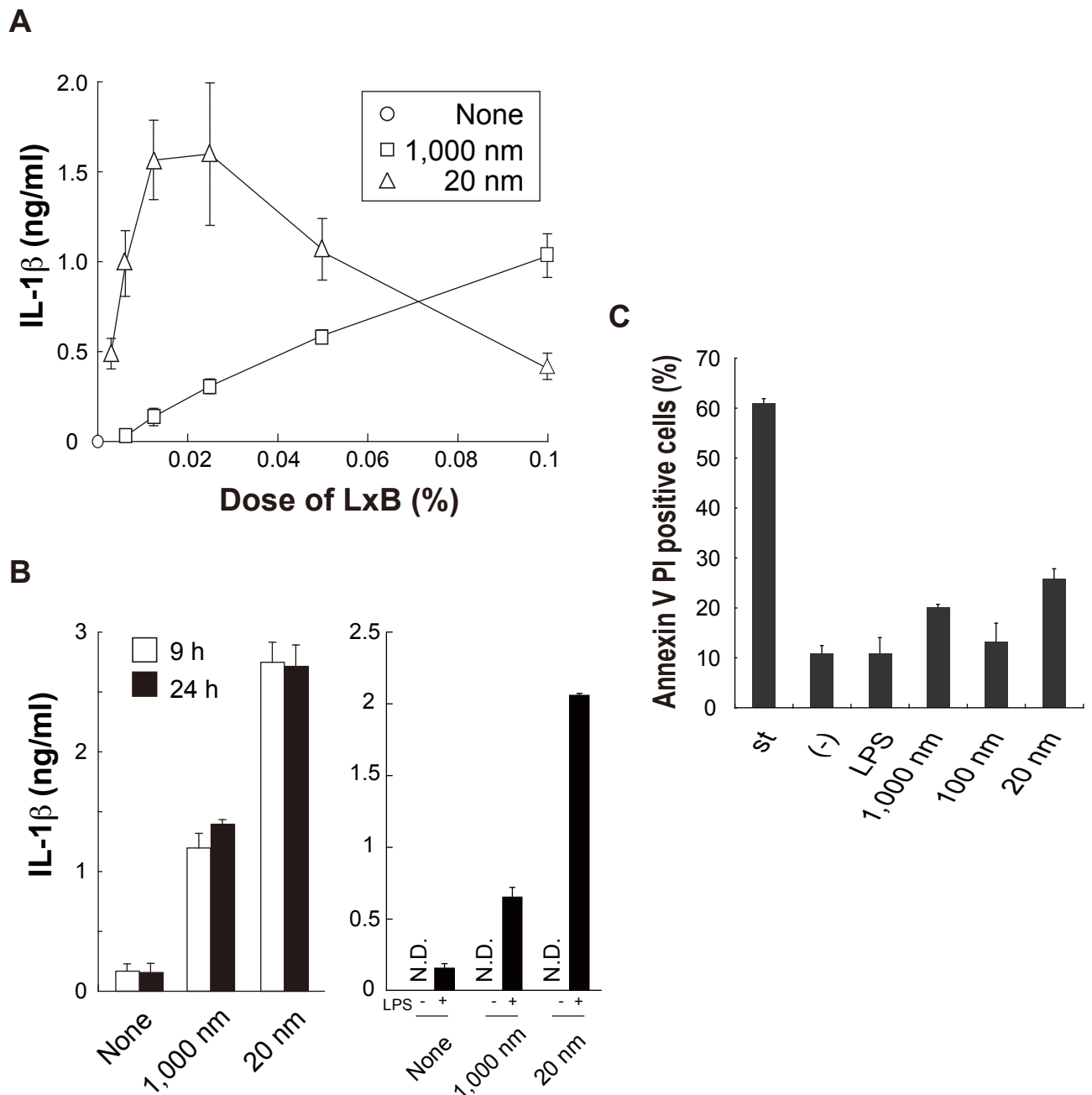


図 9. BMDM を常時混和させて培養したときの IL-1 β 産生と細胞死の評価

A. BMDM (BALB/c, 3×10^4 /ml) を 1.5 ml (100 μ l/tube) マイクロチューブにて LPS および LxB で刺激した。CO₂ インキュベーター内で常時混和させた状態で、24 時間培養し、上清中の IL-1 β を測定した。

B. BMDM を 1,000 nm (0.06%) または 20 nm (0.02%) LxB で、LPS 存在下で 9 時間もしくは 24 時間 (左図) あるいは 1,000 nm (0.06%) または 20 nm (0.02%) LxB で、LPS 存在下または非存在下で 9 時間 (右図) 常時混和状態で刺激し、上清中 IL-1 β を測定した。

C. BMDM を 1,000 nm (0.06%) 100 nm (0.02%) または 20 nm (0.02%) LxB で 9 時間常時混和状態で培養した。その後、FITC-conjugated アネキシン V と PI で染色しフローサイトメトリーで測定した。

方、1,000 nm LxB は検討した濃度域では濃度依存的に IL-1 β の産生が昂進された。

ここで、LxB の細胞毒性および IL-1 β 産生量を勘案し、20 nm および 1,000 nm LxB を 0.02% および 0.06% で使用するのが適当と考え、この条件で BMDM を刺激した際の IL-1 β 産生量を培養 9 時間または 24 時間で比較した。その結果、9 時間と 24 時間での大きな差は認められなかった (図 9B 左図)。LPS による NF- κ B の活性化に従った pro- IL-1 β 産生を付与しない限り、IL-1 β の産生はみとめられなかった (図 9B 右図)。

念のため、この条件下における細胞毒性を、細胞死誘導を指標に 9 時間の培養時に検討したところ、両 LxB 間で差はなく、9 時間後も共に約 20% 程度であった (図 9C)。これらの結果から、以後の実験は 20 nm の LxB は 0.02%、1,000 nm の LxB は 0.06% の濃度で用い、培養は 9 時間の攪拌培養とすることにした。

20 nm LxB による BMDM 内ライソソームの崩壊に伴ったカテプシン B の細胞質内への漏出

シリカ等難消化性粒子を取り込んだ M ϕ では、ライソソームの崩壊とライソソームシステインプロテアーゼの一つであるカテプシン B の漏出が起これ、これが NLRP3 インフラマソームの活性化および IL-1 β の産生に働くことが報告されている [35]。そこで、20 および 1,000 nm LxB で刺激した BMDM のライソソームの状態を蛍光色素アクリジンオレンジ (AO) にて検討した (図 10)。この色素は DNA に結合し緑色の蛍光を発すると同時に、エンドソーム経路で細胞に取り込まれ、エンドソームから細胞内に漏出した際は赤色の蛍光を発する。実験の結果、20 nm LxB で AO の細胞質内への漏出が認められた (図 10 上段)。加えて、カテプシン B 蛍光基質を用いたところ、20 nm LxB の場合に細胞質内にカテプシン B の酵素の活性を認めた (図 10 中段)。しかし、1,000 nm LxB の場合には、エンドソーム内に若干のカテプシン B の活性が確認されたのみであった。これらの結果より、20 nm LxB がライソソームの崩壊を誘導することが明らかになった。

20 nm LxB によるカテプシン B 依存的 IL-1 β 産生誘導

次に、20 nm LxB により漏出したカテプシン B の IL-1 β 産生への関与を検討した。BMDM をカテプシン B 阻害剤 (CA-074-Me) で前処理したところ、LPS および 20 nm LxB 刺激による IL-1 β 産生が大きく減少した (図 11A)。しかし、1,000 nm LxB での刺激による IL-1 β 産生は、カテプシン B 非依存的に IL-1 β 産生を誘導する ATP による IL-1 β 産生と同様にカテプシン B 阻害剤の影響を受けなかった。

さらに、カテプシン B KO マウスより調製した BMDM では 20 nm LxB による

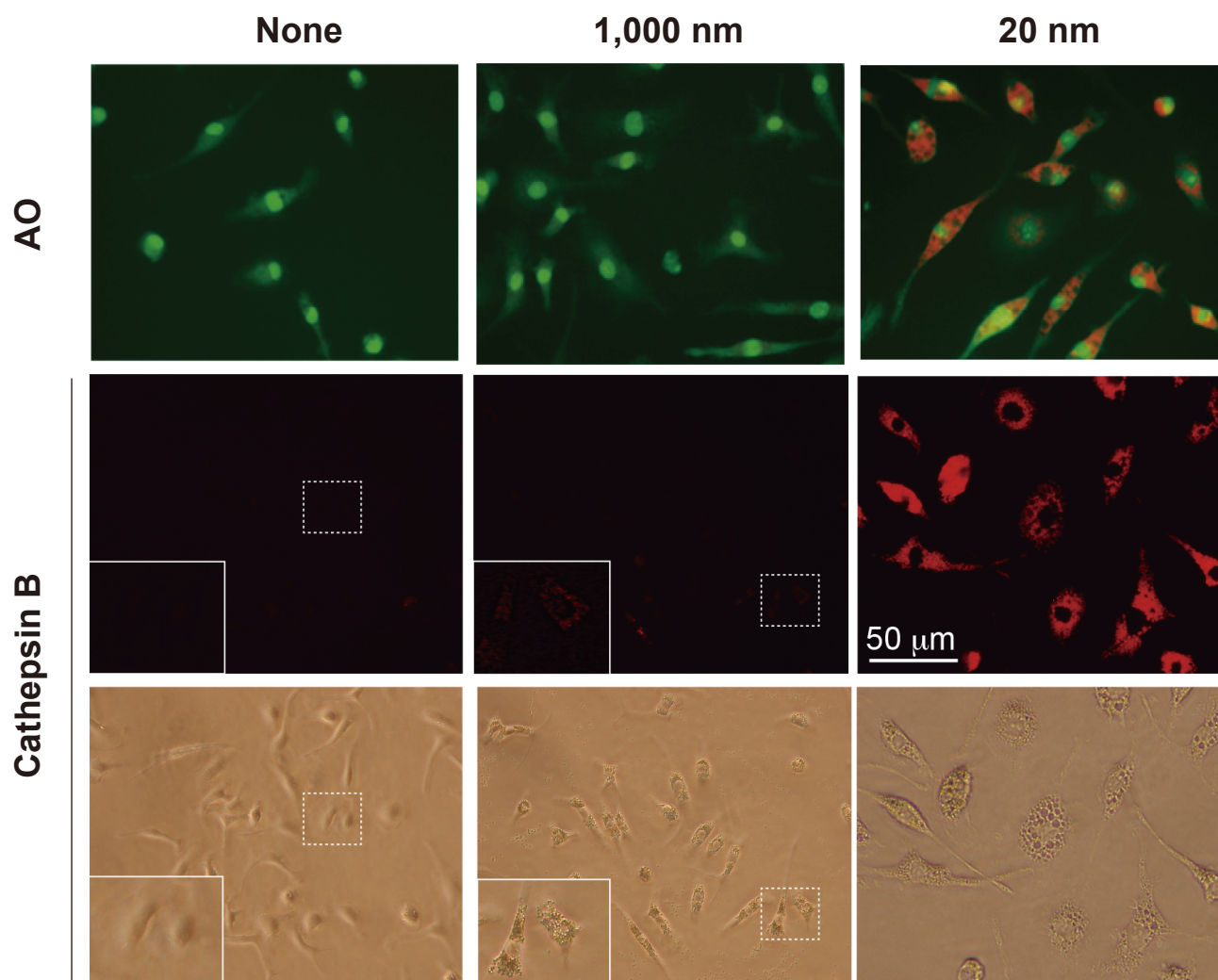


図 10. BMDM に LxB を取り込ませた際のライソソームの破裂

BMDM をガラス底培養器上で前培養した後、LPS および LxB を加え、18 時間培養した。培養時間終了 20 分前にアクリジンオレンジ (AO) または蛍光カテプシン B 基質を加えた。いくつかの写真の点線の部を左下に拡大した。

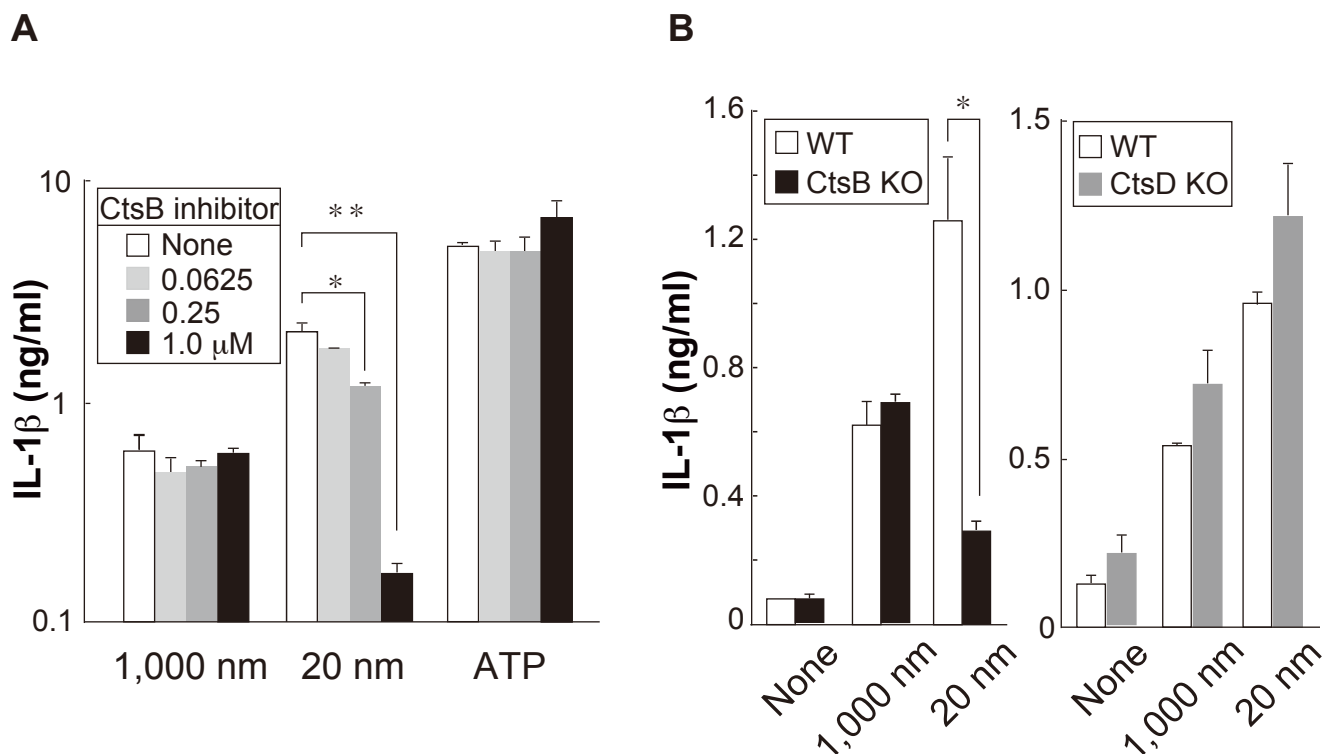


図 11. BMDM の IL-1 β 産生におけるカテプシン B の関与

A. 常時混和状態で、BMDM をカテプシン B 阻害剤 (CA-074-Me) で 1 時間前処理した後、LPS および LxB で 9 時間刺激した後に培養上清中の IL-1 β を測定した。* は $P < 0.005$ を ** は $P < 0.003$ を示す (t -test)。

B. カテプシン B、D KO マウスまたは WT の BMDM (C57BL/6) を常時混和状態で LPS および LxB を加えて 9 時間培養した後、培養上清中の IL-1 β を測定した。* は $P < 0.01$ を示す (t -test)。

IL-1 β 産生は低下したが、同じくライソソームプロテアーゼであるカテプシン D KO の BMDM では低下は全く認められなかった (図 11B)。なお、1,000 nm LxB による IL-1 β 産生はどちらの KO マウスの BMDM でも WT に比較して低下することはない。

以上の結果より、20 nm LxB による IL-1 β の産生はカテプシン B を介した細胞内経路を利用していること、1,000 nm LxB による IL-1 β 産生はカテプシン B 非依存的であることが示された。

20 nm LxB による IL-1 β 産生には ATP-P2X₇R 経路が関与する

傷害を受けた細胞から放出されるとされる細胞外の ATP は、DAMPs の一種であり、細胞膜受容体である P2X₇ レセプターに結合する。その結果、K⁺チャンネルを介して細胞内 K⁺の濃度を低下させ、NLRP3 を活性化することが知られている [35]。図 9C において、LxB によりある程度の細胞損傷が生じることから、IL-1 β 産生への ATP-P2X₇R 系の関与を検討した。

まず、細胞外の ATP を分解する ATPase のラテックスビーズアピラーゼの作用を検討したところ、20 nm LxB による IL-1 β 産生のみ低下が認められた (図 12A)。さらに、P2X₇ レセプター KO マウス骨髄から作成した BMDM においても、20 nm LxB による IL-1 β 産生のみが有意に低下した (図 12B) が、1,000 nm LxB で刺激したときの IL-1 β の産生には変化は認められなかった。

以上の結果から、20 nm LxB による IL-1 β 産生には ATP-P2X₇ レセプター経路も関与することが示唆された。

1,000 nm LxB による BMDM の ROS 産生およびダメージを受けたミトコンドリアの蓄積

前述の様に、ファゴソームや傷害を受けたミトコンドリアが産生する ROS が IL-1 β 産生に働くことが知られている [15,31]。そこで、刺激した BMDM の ROS 産生をジハイドロキシローダミン-123 (DHR-123) を用いて検討したところ、1,000 nm LxB だけでも僅かながら ROS 産生が誘導され、LPS と組み合わせるとより高い ROS 産生が認められた (図 13A)。

次に、ミトコンドリアの状態をそれぞれその体積・量および膜電位をそれぞれモニターできる Mitotracker-green および Mitotracker-deepred を用いて検討した。その結果、LPS 単独では、僅かにミトコンドリアの膜電位が上昇したが、その体積・量には変化は認められなかった。ところが、1,000 nm LxB を加えると、膜電位は僅かに低下したものの、体積・量は大きく増加した (図 13B 左図)。そのような変化

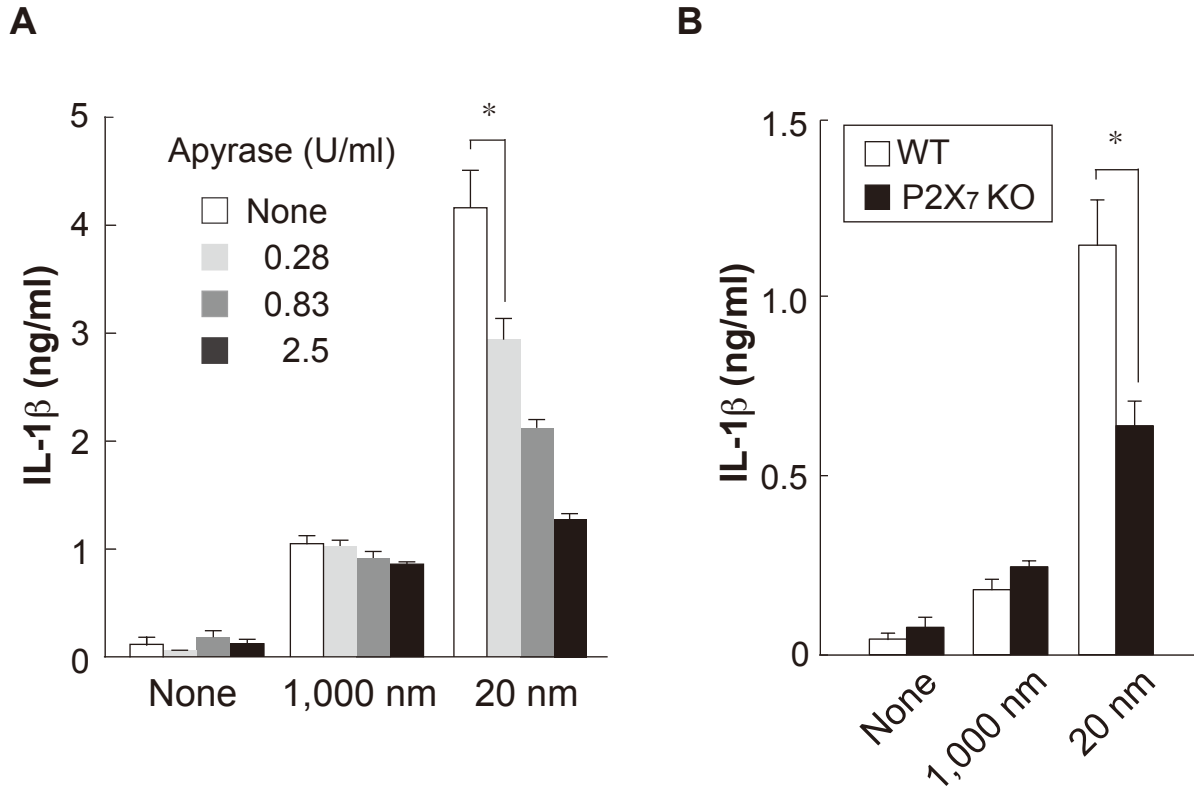


図 12. BMDM の IL-1 β 産生における ATP、P2X₇R の関与

A. アピラーゼ（Apyrase）で 1 時間前処理した BMDM に LPS および LxB を加え、9 時間培養した後、培養上清中の IL-1 β の濃度を測定した。

B. P2X₇R を欠損した BMDM と WT（C57BL/6）の BMDM を前述の方法にて LPS および LxB で刺激し、培養上清中の IL-1 β の濃度を測定した。* は $P < 0.01$ を示す (t -test)。

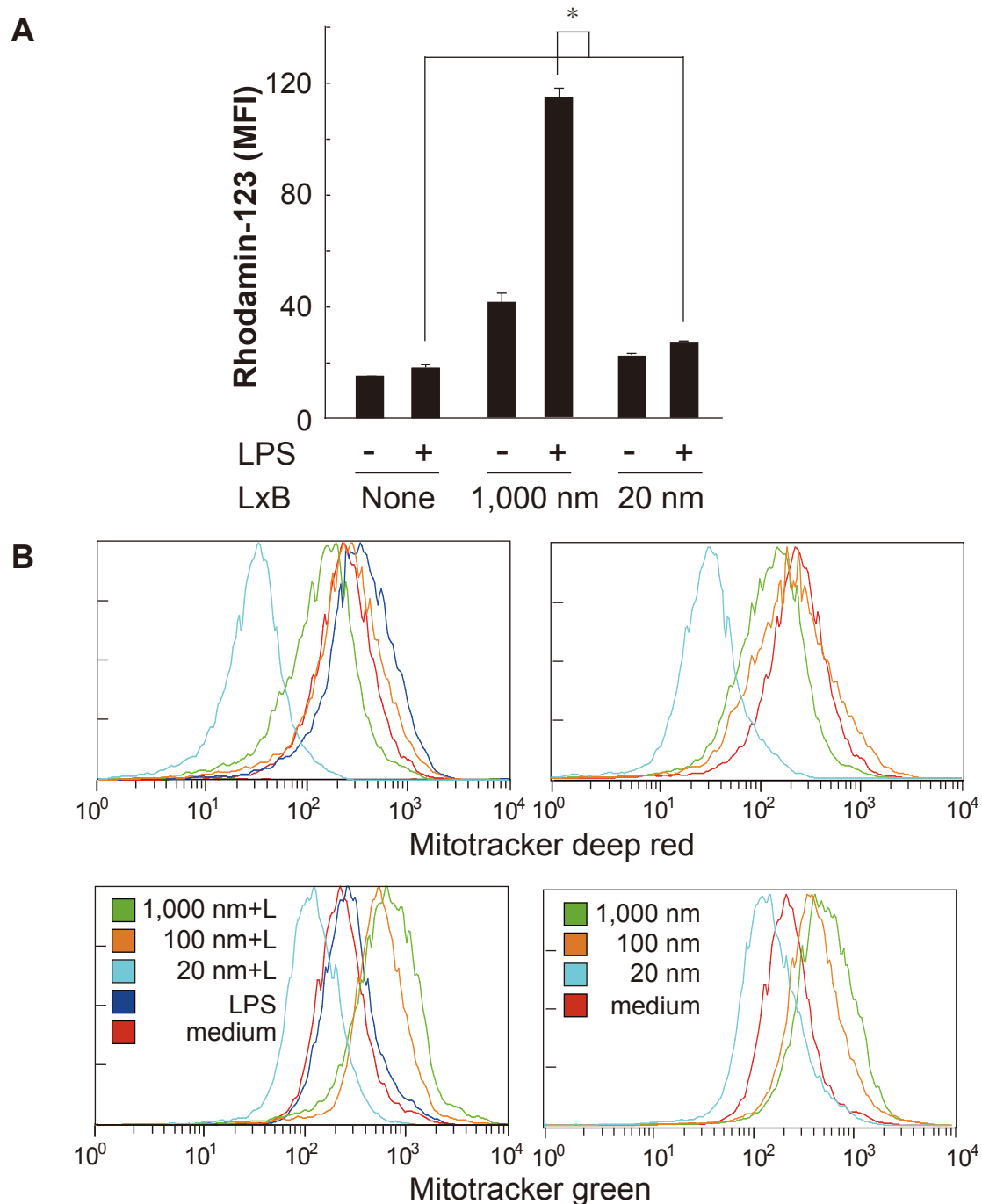


図 13. LxB 刺激後の BMDM の ROS の産生、ミトコンドリア体積・量および膜電位の変化

A. BMDM (BALB/c) を LPS および LxB で 1 時間刺激した後、さらに 10 μ M の DHR-123 とともに 20 分培養した。ROS の活性はフローサイトメトリーで解析した。

B. BMDM を LPS および LxB (左図) もしくは LxB のみ (右図) で刺激し、6 時間後に Mitotracker green (25 nM) と Mitotracker deep red (20 nM) で染色し、フローサイトメトリーでミトコンドリア量および膜電位の変化を測定した。* は $P < 0.01$ を示す (Tukey 法による多重比較検定)。

は、LPS 非存在下でも観察された（図 13B 右図）。これに対して、LPS の存否にかかわらず 20 nm LxB の場合には、ミトコンドリアの体積・量および膜電位は共に大幅に低下した（図 13B 左図）。一方、100 nm LxB では、LPS の有無にかかわらずミトコンドリアの体積・量は増加したが、膜電位は LPS 非存在下に比べて上昇することはなかった（図 13B 右図）。

したがって、20 nm LxB の刺激では強い傷害を受けたミトコンドリアが何らかの方法で除去されて減少し、1,000 nm LxB の場合は弱い傷害を受けたミトコンドリアが除去されず、ROS 産生能を維持した状態で細胞内に蓄積している可能性が示唆された。

1,000 nm LxB により誘導される ROS の IL-1 β 産生誘導

ROS は 1,000 nm LxB によってのみ誘導されることから、この ROS の IL-1 β 産生への関与を検討することにした（図 14）。この実験においては、ROS 産生を阻害する NADHP オキシダーゼ阻害剤 DPI（Diphenyliodonium）（図 14A）、および ROS スカベンジャーである NAC（N-acetylcysteine）（図 14B）と異なる作用の試薬を用いた。なお、多くのレドックスタンパクを不可逆的に不活化する DPI は、NF- κ B を介するシグナル伝達経路を抑制することによって IL-1 β 産生を阻害することが知られているが、その一方で転写抑制を介して NLRP3 を阻害することも知られている [39]。

その結果、両阻害剤は共に 1,000 nm LxB による IL-1 β の産生を有意に低下させた。これに対して、20 nm LxB 刺激においては、DPI では IL-1 β の産生は変化しなかったが、NAC 存在下では IL-1 β の産生が調べたどの濃度の NAC によっても有意に増加した。

以上の結果より、1,000 nm LxB は BMDM の ROS 産生を介して IL-1 β の産生に働くことが示された。

1,000 nm LxB による ROS 依存的な IL-1 β 産生に対する TBP-2 の関与

TBP-2/TXNIP（Thioredoxin binding protein-2/Thioredoxin-interacting protein）は内因性 ROS のレギュレーターであるチオレドキシシン（Thioredoxin: TRX）の作用に対して阻害作用をもつことが明らかになっている。また、一方で ROS の産生にともない TRX から遊離した TBP-2 タンパクは NLRP3 に直接作用し活性化する可能性があることが示唆されている [33]。そこで 1,000 nm LxB による ROS を介した IL-1 β 産生における TBP-2 の関与を検討した。

予想に反して、TBP-2 KO マウス骨髄から作成した BMDM を LxB にて刺激した

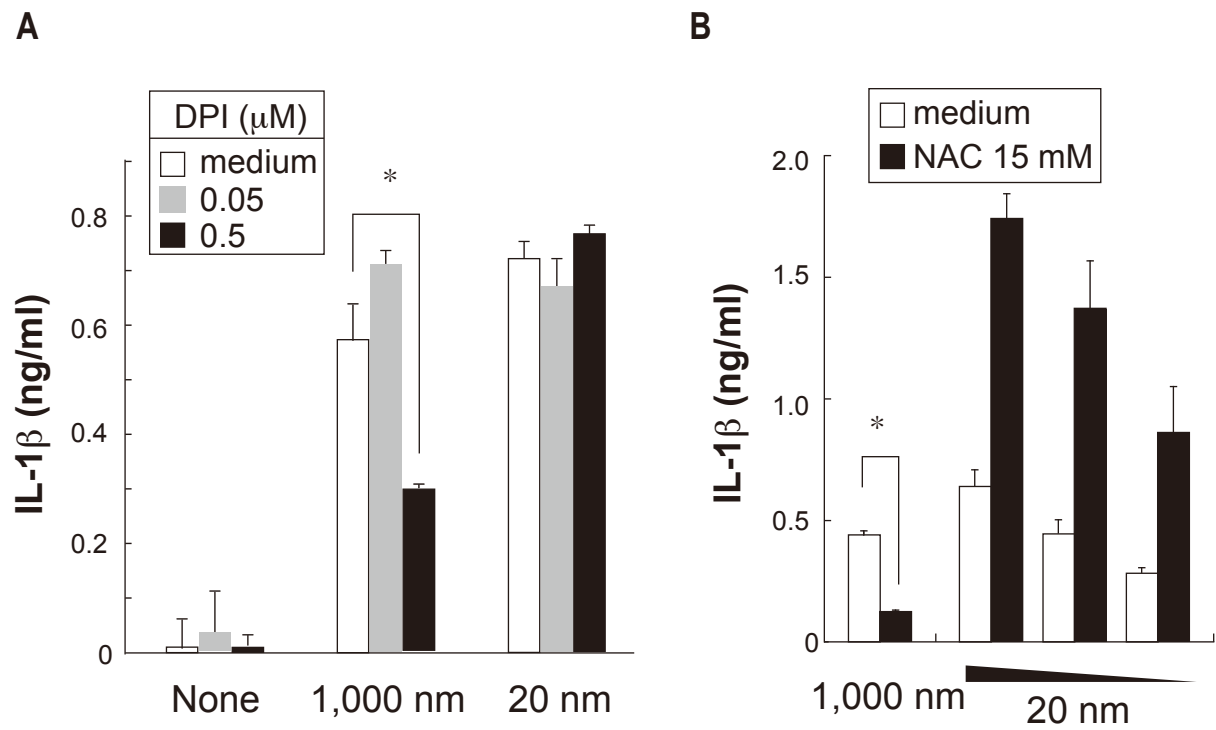


図 14. BMDM の IL-1β 産生における ROS の関与

A. BMDM (BALB/c) を LPS で 3 時間刺激した後に DPI で 1 時間処理し、LPS および LxB を加え、さらに 9 時間培養した。

B. BMDM (BALB/c) を NAC (15 mM) で 1 時間前処理し、LPS、および LxB を加え、さらに 9 時間培養した。* は $P < 0.01$ を示す (t -test)。

結果では、1,000 nm LxB による IL-1 β 産生に変化は認められなかった (図 15)。したがって、1,000 nm LxB の作用には TBP-2-NLRP3 系は関与しないものと考えられる。一方で 20 nm LxB の影響に従った IL-1 β の産生は僅かながら有意な上昇を示した。ROS スカベンジャー NAC で前処理した場合でも、20 nm LxB による IL-1 β の産生上昇が認められたこと、TBP-2 が ROS の産生の負の調整因子であることから、20 nm LxB によるカテプシン B を介した IL-1 β の産生においては、わずかに産生される ROS が負の影響をもたらしている可能性が考えられる。

1,000 nm LxB によるミトコンドリアの蓄積における Parkin の関与

図 11 の結果より、1,000 nm LxB により弱い損傷を受けたミトコンドリアが細胞内に蓄積することが示唆されている。通常、膜電位の低下など機能の落ちたミトコンドリアはその表面に Pink1 タンパク質がたまり、これにユビキチンリガーゼ Parkin/PARK2 が結合する[40]。その結果、表面タンパク質のユビキチン化が生じこれが目印となりミトファジー (ミトコンドリア特異的なオートファジー) によりミトコンドリアが除去される。

そこで、1,000 nm LxB 刺激時の IL-1 β の産生量を WT と比較した。対照として 20 および 100 nm LxB を用いた。その結果、Parkin KO BMDM において、1,000 nm LxB 刺激時においてのみ IL-1 β 産生が上昇したが、20 nm LxB では変化は無く、100 nm LxB では IL-1 β 産生が誘導されることはなかった (図 16)。おそらく、1,000 nm LxB によりダメージを受けたミトコンドリアはある程度の割合で Parkin により処理されていると予想されるが、速度的な問題でミトコンドリアの蓄積が起こるものと予想される。

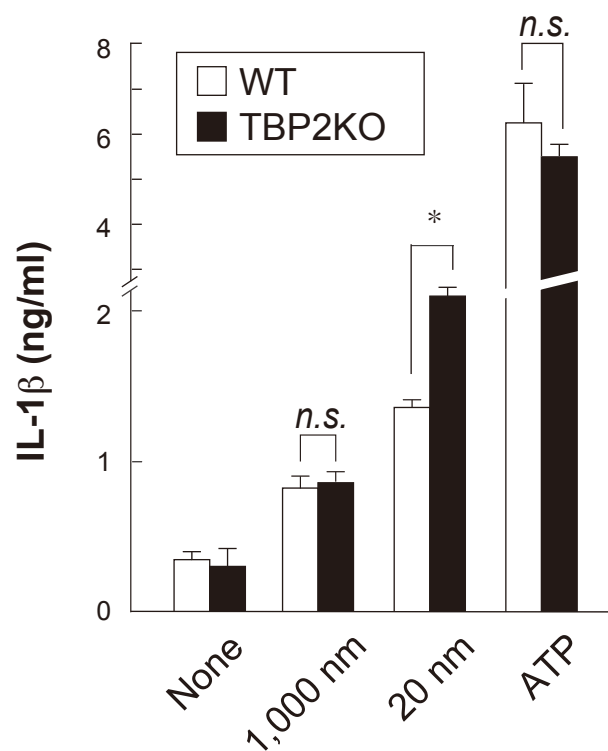


図 15. BMDM の IL-1 β 産生における TBP-2 の関与

TBP-2 KO マウスまたは WT (C57BL/6) の BMDM を LPS および LxB で 9 時間刺激し、IL-1 β の産生を測定した。* は $P < 0.01$ (t-test)、n.s. : 有意差無し。

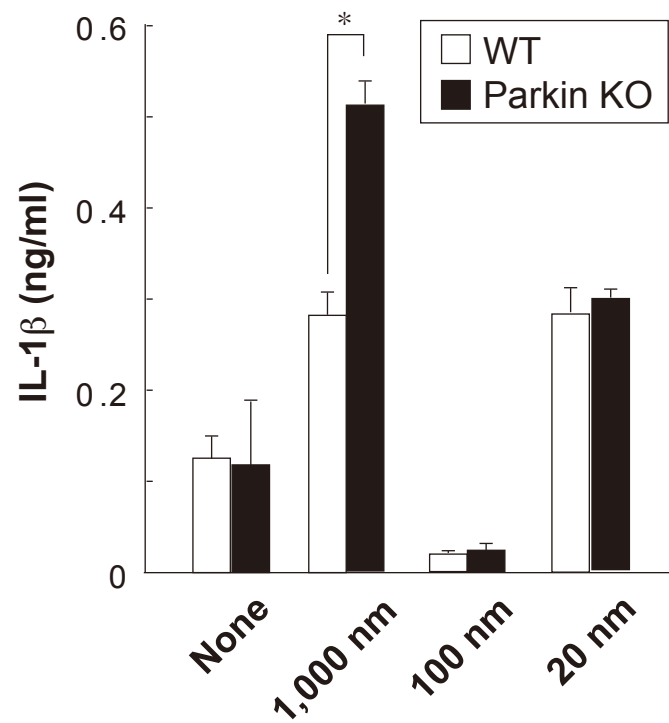


図 16. BMDM の IL-1 β 産生におけるパーキンの関与

パーキン (Parkin) 欠損または WT (C57BL/6) の BMDM を LPS、LPS および LxB で 9 時間刺激し、IL-1 β の産生を測定した。* は $P < 0.01$ (t -test) を示す。

考察

本研究では、サイズの異なる均一な LxB を用いて、BMDM における NLRP3 インフラマソーム依存的な IL-1 β 産生誘導経路に違いがあることを明らかにした (図 17)。これは、粒子のサイズに特有な細胞応答メカニズムが存在していることを示すものである。

カテプシン B はライソソームに存在するシステインプロテアーゼで、タンパクのターンオーバーに関わっているとされている[41]。また、カテプシン B を含むシステインプロテアーゼがアポトーシスを抑制している Bid や Bcl-2 を切断することでアポトーシスの開始に関わっていることが示唆されている [42]。したがって、本研究において認められた、20 nm LxB 刺激のミトコンドリアの膜電位および体積・量の低下も、カテプシン B によって引き起こされている可能性があり、カテプシン B 阻害剤添加時におけるミトコンドリアの状態を検討する必要がある。一方で、コレステロール結晶による M ϕ のライソソームの破壊とそれに続く IL-1 β 産生の場合は、カテプシン B 同様にカテプシン L も働くと報告されている [23]。カテプシンには重複する作用があると考えられ、今回、20 nm LxB による IL-1 β 産生の場合も他のカテプシンファミリーが働いている可能性は排除できない。しかし、20 nm の LxB 刺激においては、カテプシン B 単独の欠損でも顕著に IL-1 β 産生が減少するため、この酵素が主要な働きをしていると思われる。いずれにしても、粒子の性状によっても作用するカテプシンが異なる可能性も残されており、今後の研究ではこの点の解析が待たれる。

上記の 20 nm LxB 刺激時のミトコンドリア体積・量の低下は、大規模なクリアランスが働いた結果と予想されるが、詳細を明確にすることはできなかった。しかし、20 nm LxB が 1,000 nm LxB より強いミトコンドリア傷害を引き起こすことから、これが引き金となり強力なオートファジー/ミトファジーが働いた可能性もある。今回、電子顕微鏡像にて典型的なオートファジーの特徴とする 2 重膜構造をはっきりと観察するには至らなかったが、上記の仮説は 20 nm LxB による BMDM の LC3⁺シグナルの誘導と、その後の空胞への融合との一連の結果と矛盾がないと考えられる。

オートファジー関連タンパクの atg16L 1 を欠損させた場合、LPS 刺激による IL-1 β 産生が亢進することが示されており [43]、ミトファジーに働く ULK1 を欠損

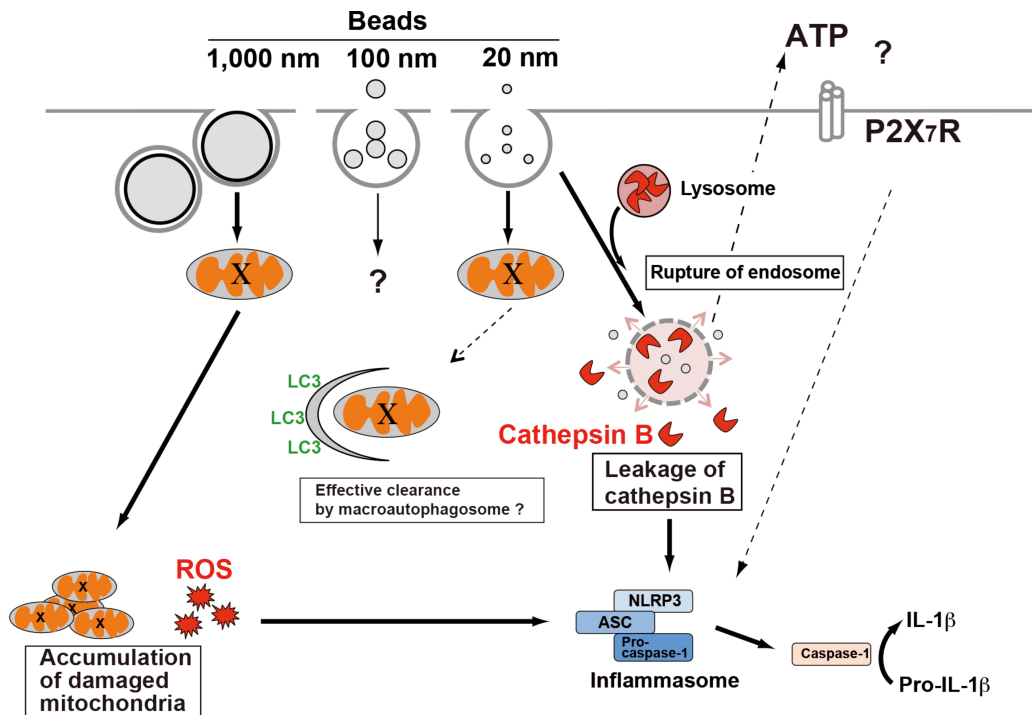


図 17. マイクロサイズ、ナノサイズのラテックスビーズの影響による IL-1 β 産生メカニズムの違い

pro-IL-1 β 産生を誘導する LPS 存在下で BMDM をマイクロサイズ (1,000 nm) のラテックスビーズで刺激した場合、ROS の産生と ROS 産生源と思われる傷害を受けたミトコンドリアの蓄積に依存した NLRP3 インフラマソームの活性依存的な IL-1 β 産生が誘導される。一方でナノサイズ (20 nm) のラテックスビーズはライソソームの崩壊を引き起こし、システインプロテアーゼであるカテプシン B の細胞室内漏出をもたらし、NLRP3 インフラマソーム依存的な IL-1 β 産生を誘導する。しかし、100 nm のラテックスビーズで刺激した場合では IL-1 β 産生が誘導されない。すなわちマイクロサイズのラテックスビーズによる ROS 依存的な経路およびナノサイズのラテックスビーズによるライソソームの崩壊・カテプシン B に依存的な経路がそれぞれ独立して存在することを暗に意味している。

させた M ϕ では、傷害を受けたミトコンドリアの蓄積、ミトコンドリアの ROS の産生およびカスパーゼ-1 の活性が亢進されることも報告されている [44]。これらの報告は、オートファジー/ミトファジーは IL-1 β 産生において負に働いていることを示唆しており、さらに 20 nm LxB の場合は大規模なミトコンドリアのクリアランスが ROS 依存的な IL-1 β 産生経路を遮断している可能性が考えられる。しかし一方

では、オートファジーにかかわるコンポーネント atg5 を欠損したマウス BMDM では、IL-1 β の分泌が減少するという報告もある [45]。20 nm LxB により形成される特徴的な空胞の機能と、IL-1 β 産生への関与を含め、他のオートファジー関連タンパクの働きを視野に入れ解析する余地があると思われる。

微細粒子に対する IL-1 β 産生に ROS が働くことについては多数の報告がある。今回の研究においても 1,000 nm LxB における IL-1 β 産生に ROS が必要である事が明らかになった。しかしながら、依然として不明な点もある。例えば、ROS 産生の場合として主にファゴソームとミトコンドリアが挙げられるが、1,000 nm LxB がどちらから ROS 産生を起こすのかが明確ではない。今回の実験も含め、ROS の機能を検討する場合、ROS 自体を捕捉・不活化スカベンジする試薬もしくはファゴソームとミトコンドリアで働く NADPH オキシダーゼの阻害剤（本研究ではそれぞれ NAC および DPI）が多用されている。これらの阻害剤では、ROS 産生がファゴソームとミトコンドリアのどちらに依存するのかを区別できない。しかしながら、ファゴソーム NADPH オキシダーゼ（サイトクローム B）に特異的なサブユニット gp91phox を欠失した BMDM においても、シリカおよび LPS 刺激下において IL-1 β 産生に影響は無いことが報告されていることから[27]、この場合はミトコンドリアからの ROS が働いているものと予想できる。また、これは 20 nm LxB においてミトコンドリアのクリアランスにより ROS 産生が起こらないとの本研究において導かれた推論とも一致する。

さまざまな NLRP3 の刺激因子によりミトコンドリアの傷害と蓄積が見られることが知られている [31]。本研究における 1,000 nm LxB 刺激の場合も、障害（損傷）を受けたミトコンドリアが蓄積していることが明らかである。私は、このミトコンドリアのクリアランスを検討するために、パーキンソン病関連遺伝子 Parkin を欠損させた BMDM を用いた。Parkin は定常状態において、機能の低下した、すなわち膜電位がわずかに低下したミトコンドリアを分解に導くユビキチンリガーゼである。実験の結果、Parkin KO BMDM では、IL-1 β の産生が昂進することを確認めた。Parkin 欠失によるミトコンドリアの一層の蓄積は確認できていないが、おそらく、1,000 nm LxB では大量の弱く傷害を受けたミトコンドリアが同時に発生し、Parkin 系では十分にクリアランス出来ないために、その蓄積とそれに続く ROS 産生が起きるものと予想できる。

ROS による IL-1 β 産生の経路としては TBP-2 の関与が報告されている [33]。しかしながら、1,000 nm LxB の IL-1 β 産生の場合は ROS 依存的であるにもかかわらず、TBP-2 の欠失は影響しなかった。TBP-2 以外で ROS と NLRP3 の活性化を繋ぐもの

としては酸化型 DNA (oxDNA) が挙げられる。この例では、傷害を受けたミトコンドリアが産生する ROS が自身の DNA を酸化し、これがミトコンドリアから放出されることにより細胞質の NLRP3 を活性化させるとされている[17]。今後、1,000 nm LxB の場合にこの経路が関与しているかを DNase の細胞質内投与の実験などで検討する必要がある。

本実験では、粒子の大きさに注目して検討を進めたが、粒子の表面物性によっても細胞内経路の違いが起こる可能性もある。例えば、マイクロメートルサイズの粒子でもその表面を“金平糖”ようにすると、カテプシン B 依存的な IL-1 β 産生が起きることが報告されている [46]。粒子の表面の構造や電荷が異なることで、IL-1 β 産生のメカニズムに影響を与えると予想され、実際の微細粒子が細胞に与える影響を考える際にはその物性にも考慮することが重要であると思われる。

私は、細胞に微細粒子のサイズに依存した細胞内応答経路が存在することを明らかにした。しかし、依然として不明な点も多い。特に、1,000 および 100 nm LxB ではなぜファゴソーム/ライソソームの破壊が起こらないのか、20 nm LxB との表面積の違いが原因だとするとそれが細胞内で何を起こすのか等の疑問は絶えない。また今後、異なる細胞内経路が IL-1 β 以外にいかなる細胞応答の差を誘導するかを明らかにすることで、微細粒子が引き起こす疾患等の機構解明、また微細粒子の免疫賦活剤や不応答サイズ領域の微細粒子を使ったドラッグデリバリーへの応用等が可能になるかもしれない。

謝辞

本研究は京都大学大学院 生命科学研究科 高次生命科学専攻 生体応答学分野 稲葉カヨ教授、高原和彦講師、伊豫田智典助教のご指導のもと行われました。免疫学の素養がない私を博士後期課程の学生としておいて頂いたこと、これまで丁寧な指導、助言をしていただいたこと誠に感謝しております。

LC3-GFP ノックインマウス、NLRP3 KO マウス、Parkin KO、TBP2 KO、P2X₇ KO、カテプシン B KO とカテプシン D KO マウス骨髓細胞をご提供してくださいました、東京医科歯科大学の水島昇先生、Genentech 社 Dr.V. M. Dixit 博士、京都大学高橋良祐先生、淀井淳司先生、九州大学石橋達郎先生、順天堂大学内山安男先生、さまざまな助言をくださいました大阪大学 iFReC 斎藤達哉先生に心よりお礼を申し上げます。

また、本研究を行う上で惜しまない協力をいただきました研究室の方々、OB、OG の皆様に厚くお礼申し上げます。

最後に、経済的ならびに精神的に支えてくれた両親、家族にも感謝の意を表します。

参考文献

1. Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, et al. (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol* 4: 634-641.
2. Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC (2008) Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol* 3: 145-150.
3. Watari F, Takashi N, Yokoyama A, Uo M, Akasaka T, et al. (2009) Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. *J R Soc Interface* 6 Suppl 3: S371-388.
4. Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, et al. (2009) Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett* 191: 1-8.
5. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P (1960) Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 17: 260-271.
6. Manning CB, Vallyathan V, Mossman BT (2002) Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *Int Immunopharmacol* 2: 191-200.
7. Miller MR, Shaw CA, Langrish JP (2012) From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Future Cardiol* 8: 577-602.
8. Mutsaers SE, Prele CM, Brody AR, Idell S (2004) Pathogenesis of pleural fibrosis. *Respirology* 9: 428-440.
9. Donaldson K, Poland CA, Murphy FA, Macfarlane M, Chernova T, et al. (2013) Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - Similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*.
10. Leung CC, Yu IT, Chen W (2012) Silicosis. *Lancet* 379: 2008-2018.
11. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-232.
12. Sims JE, Smith DE (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 10: 89-102.

13. Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.
14. Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16-34.
15. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, et al. (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459: 433-436.
16. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-241.
17. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, et al. (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36: 401-414.
18. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, et al. (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12: 222-230.
19. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, et al. (2010) Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 11: 897-904.
20. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, et al. (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 9: 857-865.
21. Niemi K, Teirila L, Lappalainen J, Rajamaki K, Baumann MH, et al. (2011) Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol* 186: 6119-6128.
22. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, et al. (2010) Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 5: e11765.
23. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, et al. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464: 1357-1361.
24. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA (2008)

- Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453: 1122-1126.
25. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, et al. (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320: 674-677.
 26. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, et al. (2008) The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9035-9040.
 27. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, et al. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9: 847-856.
 28. Palomaki J, Valimaki E, Sund J, Vippola M, Clausen PA, et al. (2011) Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano* 5: 6861-6870.
 29. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, et al. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14: 1583-1589.
 30. Riteau N, Baron L, Villeret B, Guillou N, Savigny F, et al. (2012) ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis* 3: e403.
 31. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221-225.
 32. Lee GS, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, et al. (2012) The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* 492: 123-127.
 33. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11: 136-140.
 34. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101-1111.
 35. Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, et al. (2007) Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via

- endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum Mol Genet* 16: 50-60.
36. Oka S, Liu W, Masutani H, Hirata H, Shinkai Y, et al. (2006) Impaired fatty acid utilization in thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. *FASEB J* 20: 121-123.
 37. Deussing J, Roth W, Saftig P, Peters C, Ploegh HL, et al. (1998) Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4516-4521.
 38. Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, et al. (1995) Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 14: 3599-3608.
 39. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, et al. (2011) Cutting edge: Reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 187: 613-617.
 40. Hauser DN, Hastings TG (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis* 51: 35-42.
 41. Guha S, Padh H (2008) Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J Biochem Biophys* 45: 75-90.
 42. Repnik U, Turk B (2010) Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 10: 662-669.
 43. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, et al. (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456: 264-268.
 44. Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, Vogel P, Milasta S, et al. (2013) Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat Immunol* 14: 480-488.
 45. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, et al. (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J* 30: 4701-4711.
 46. Vaine CA, Patel MK, Zhu J, Lee E, Finberg RW, et al. (2013) Tuning innate

immune activation by surface texturing of polymer microparticles: the role of shape in inflammasome activation. *J Immunol* 190: 3525-3532.